



TITLE:

Studies on enzymatic synthesis of optically active amides for pharmaceutical intermediates( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

Nojiri, Masutoshi

---

CITATION:

Nojiri, Masutoshi. Studies on enzymatic synthesis of optically active amides for pharmaceutical intermediates. 京都大学, 2018, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2018-03-26

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.r13178>

RIGHT:

( 続紙 1 )

京都大学	博士（農学）	氏名	野尻 増俊
論文題目	Studies on enzymatic synthesis of optically active amides for pharmaceutical intermediates (医薬品として有用な光学活性アミド類の酵素合成に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>光学活性アミンは、低分子医薬品の構成要素として有用な化合物である。従って、光学活性アミンの効率的な製法研究が活発に行われている。本研究では、光学活性アミンの合成にホフマン転位反応による化学合成ステップを導入することを前提に、前駆体となる光学活性アミド類を酵素合成することを目的とした。特に、プロキラルなアミドやイミドを基質に理論収率100%で光学活性アミドを合成することを試みた。</p> <p>第1章では、3-置換グルタル酸ジアミド不斉加水分解反応を触媒するアミダーゼの開発を行った。光学活性アミンである(<i>R</i>)-バクロフェンは、アルコール中毒薬として開発されており、前駆体となる(<i>R</i>)-3-(4-クロロフェニル)グルタル酸モノアミド(CGM)の酵素合成を目的とした。プロキラルな3-(4-クロロフェニル)グルタル酸ジアミド(CGD)を用いて、集積培養法により目的酵素の生産菌を探索した。その結果、CGDを加水分解し(<i>R</i>)-CGMを選択的に生成する微生物を4株取得し、中でも高い立体選択性を示した<i>Comamonas</i> sp. KNK3-7を選抜し、目的酵素の同定を行った。本酵素は、504アミノ酸残基から構成されるアミダーゼ(<i>CoAM</i>)であり、ニトリル資化性菌として報告のある<i>Pseudomonas chlororaphis</i> B23由来アミダーゼと87%の相同性を示した。続いて、<i>CoAM</i>を高生産する組換え大腸菌を育種し、CGD加水分解反応の評価を行った。21 mM CGDでは高収率でCGMへと変換されるのに対して、166 mM CGDでは、反応終盤での反応の停滞が顕著であった。そこで、より高効率な反応を実現できる<i>CoAM</i>変異酵素を創製することとした。X線結晶構造解析の結果が報告されている<i>Rhodococcus</i> sp. N-771由来アミダーゼと<i>CoAM</i>のアミノ酸配列を比較し、活性部位を構成すると推測された146番目のアミノ酸残基に着目し、部位特異的変異導入により優良酵素の取得を試みた。その結果、野生型のロイシン残基をメチオニン残基、アラニン残基に置換した変異酵素L146M、L146Aを用いることで、166mM CGD加水分解反応の効率を大幅に向上させることに成功した。</p> <p>第2章では、3-置換グルタルイミド不斉加水分解反応を触媒するイミダーゼの開発を行った。(<i>R</i>)-バクロフェンの前駆体となる(<i>R</i>)-CGMの酵素合成原料としては、プロキラルな3-(4-クロロフェニル)グルタルイミド(CGI)を用いた。スクシンイミド資化性菌、保存菌株をスクリーニング源とし、休止菌体反応での評価により目的酵素の生産菌を探索した結果、CGIを加水分解し(<i>R</i>)-CGMを選択的に生成する微生物を8株取得し、高い立体選択性を示した微生物として<i>Burkholderia phytofirmans</i> DSM17436、<i>Alcaligenes faecalis</i> NBRC13111を選抜した。続いて、<i>B. phytofirmans</i> DSM17436由来イミダーゼ(BpIH、316アミノ酸残基)及び<i>A. faecalis</i> NBRC13111由来イミダーゼ</p>			

(AfIH、310アミノ酸残基)を同定した。それぞれurate catabolism protein、allantoinaseと分類され、互いの相同性は75%であった。さらに、BpIH、AfIHを高生産する組換え大腸菌を育種後、組換え酵素を精製し諸性質を評価した。基質特異性、pHや温度に対する安定性、至適pH/温度、金属イオン依存性については両酵素ともに類似の性質を示したが、3-イソブチルグルタルイミドを基質とした際に生成する(*R*)-3-イソブチルグルタル酸モノアミドの光学純度はBpIHで95.3% *e. e.*、AfIHで89.4% *e. e.*と、選択性に差が認められた。

第3章では、ラセミ体アミド化合物の光学分割反応を触媒するアミダーゼの開発と応用に取り組んだ。光学活性環状アミン、(*R*)-3-アミノピペリジンは複数の上市済み糖尿病薬(DPP-4阻害剤)の鍵構造として使用されている有用化合物である。前駆体となる(*R*)-3-ピペリジンカルボキサミドの酵素合成を目指して検討を行った。原料としては、ラセミ体*N*-ベンジル-3-ピペリジンカルボキサミド(BNPD)を用い、保存菌株をスクリーニング源とし、休止菌体反応での評価により探索した。その結果、ラセミ体BNPDを(*S*)-体選択的に加水分解する微生物を24株取得し、中でも高い立体選択性及び安定性を示した*Cupriavidus* sp. KNK-J915を選抜し、目的酵素の同定を行った。本酵素は、447アミノ酸残基からなるアミダーゼ(*CsAM*)であり、*Cupriavidus necator* JMP134ゲノム上のアミダーゼとアノテーションされる相同遺伝子産物(*CnAM*)と78%の相同性を示した。続いて*CsAM*、*CnAM*を高生産する組換え大腸菌を育種し、ラセミ体BNPD及びラセミ体3-ピペリジンカルボキサミドの加水分解反応の評価を行った。両酵素共にラセミ体BNPDに対しては高い(*S*)-体選択性(The value of enantioselectivity; *E*値=120以上)を示した。また、*CsAM*は*N*-保護基の有無に関わらず高い立体選択性を示す、広い適用性が期待されるアミダーゼであった。

続いて、*CsAM*の酵素的な不斉合成反応への応用を検討した。(*R*)-イソバリンはGABA受容体を活性化させることが知られており、新薬開発に利用されている化合物である。そこで、前駆体となる(*S*)-2-エチル-2-メチルマロンアミド酸(EMA)の酵素合成を目的とし*CsAM*の適用検討を行った。原料としては、プロキラルな2-エチル-2-メチルマロンアミド(EMM)を用いた。*CsAM*を高生産する組換え大腸菌を用いて、反応温度30℃にて、208 mMならびに624 mMのEMMに対する加水分解反応を評価したところ、それぞれ99.0% *e. e.*、98.6% *e. e.*の(*S*)-EMAが得られた。続いて、本酵素反応工程を含む(*R*)-イソバリンの調製実験を行った。ジエチル-2-メチルマロン酸を原料として80 gのEMMを調製後、*CsAM*組換え大腸菌培養液を用いた(*S*)-EMAの酵素合成、ホフマン転位反応を経て、総収率74.9%で48.7gの(*R*)-イソバリン(99.1% *e. e.*)を得た。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し  
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

低分子医薬品の有用中間体となる光学活性アミンは、ホフマン転位反応によって光学活性アミドから合成できる。本論文では、アミド結合を立体選択的に加水分解できるアミダーゼ、イミダーゼを利用することで、プロキラルなアミドやイミドを基質に理論収率100%で光学活性アミドを合成する新規酵素合成法や、ラセミ体アミドの不斉加水分解反応が検討されており、評価すべき点として以下の3点が挙げられる。

1. 3-(4-クロロフェニル)グルタル酸ジアミドを加水分解し(*R*)-3-(4-クロロフェニル)グルタル酸モノアミド (CGM) を選択的に生成する *Comamonas* sp. KNK3-7由来アミダーゼ CoAMを同定した。CoAMの146番目のアミノ酸残基であるロイシンをメチオニン、アラニンに置換した変異酵素L146M、L146Aを用いることで、高濃度CGD (166 mM) の加水分解反応の効率を大幅に向上させることに成功した。
2. 3-(4-クロロフェニル)グルタルイミド (CGI)を加水分解し(*R*)-CGMを選択的に生成する *Burkholderia phytofirmans* DSM17436ならびに *Alcaligenes faecalis* NBRC13111を取得し、それぞれの菌株に由来するイミダーゼBpIHとAfIHを同定した。両酵素の諸性質を明らかにし、CGIだけでなく3-イソブチルグルタルイミドを加水分解し(*R*)-3-イソブチルグルタル酸モノアミドを選択的に生成する反応にも応用可能であることを示した。
3. ラセミ体の*N*-ベンジル-3-ピペリジincarボキサミドを(*S*)-体選択的に加水分解可能な *Cupriavidus* sp. KNK-J915由来のアミダーゼ、CsAMを同定した。CsAMはプロキラルな2-エチル-2-メチルマロンアミドに対しても(*S*)-体高選択的な活性を有しており、(*R*)-イソバリンの前駆体となる(*S*)-2-エチル-2-メチルマロンアミド酸の酵素合成に応用可能であった。本反応とホフマン転位反応を組み合わせることで、(*R*)-イソバリンがグラムスケールで合成可能であることを実証した。

以上のように、本論文は、医薬品合成中間体光学活性アミドの生産に有用な微生物酵素について、探索、諸性質解明に取り組み、その応用の可能性を示したものであり、発酵生理学、応用微生物学、酵素工学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成30年2月13日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)